

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.006

· 基础研究 ·

沉默 HMGB1 基因对裸鼠人上皮性卵巢癌移植瘤生长的抑制作用

吴美琴¹, 王勇², 朱宏飞³, 宋晓婕¹, 李玉霞¹, 刘智慧¹, 赵述艳³, 袁晶³, 龚晶晶³, 梁行³, 陈丹丹³, 宁向程³(1. 华中科技大学同济医学院附属武汉市儿童医院(武汉市妇幼保健院)妇产科, 湖北武汉 430015; 2. 武汉大学动物实验中心, 湖北武汉 430070; 3. 湖北省中医院暨湖北省中医药研究院, 湖北武汉 430070)

[摘要] **目的:** 探讨高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 基因对裸鼠人上皮性卵巢癌移植瘤生长的影响。**方法:** 选取对数生长期的人上皮性卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞建立裸鼠人上皮性卵巢癌移植瘤模型, 将造模成功的裸鼠随机分成对照组和 HMGB1-siRNA 组, 分别在接种细胞后第 7、9、11、14、16 天于荷瘤鼠腋下注射等量的生理盐水和 HMGB1-siRNA。3 周后颈椎脱臼法处死裸鼠、分离肿瘤组织, 测量肿瘤的体积并绘制肿瘤生长曲线, 以 TUNEL 染色法检测移植瘤细胞的凋亡情况, Western blotting 检测移植瘤组织中 HMGB1、STAT3、p-STAT3 的表达水平, 免疫组化染色技术检测移植瘤组织中 VEGF-A 的表达和微血管形成情况。**结果:** 与对照组相比, HMGB1-siRNA 组的肿瘤体积增长速度减缓, 第 21 天起 HMGB1-siRNA 组的肿瘤体积显著小于对照组 ($P < 0.05$); HMGB1-siRNA 成功敲降了移植瘤组织细胞中 HMGB1 mRNA 的表达, 移植瘤组织中 HMGB1-siRNA 组的细胞凋亡率较对照组显著升高 [(34±8)% vs (6±2)%, $P = 0.04$], HMGB1 和 p-STAT3 表达显著降低 ($P < 0.05$), VEGF-A 表达和微血管数均显著低于对照组 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 敲降 HMGB1 基因可能通过抑制 HMGB1/STAT3 信号通路降低 VEGF-A 的表达和微血管形成, 从而促进肿瘤组织细胞凋亡和减缓移植瘤生长。

[关键词] 高迁移率族蛋白 B1; 卵巢癌; SKOV3 细胞; VEGF; 凋亡

[中图分类号] R735.2; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0629-05

Inhibitory effect of silencing HMGB1 gene on growth of human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice

WU Meiqin¹, WANG Yong², ZHU Hongfei³, SONG Xiaojie¹, LI Yuxia¹, LIU Zhihui¹, ZHAO Shuyan³, YUAN Jing³, GONG Jingjing³, LIANG Xing³, CHEN Dandan³, NING Xiangcheng³(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Children's Hospital & Wuhan Maternal and Child Health Care Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430015, Hubei, China; 2. Animal Laboratory Center, Wuhan University, Wuhan 430070, Hubei, China; 3. Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine & Hubei Institute of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430070, Hubei, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of HMGB1 gene on the growth of human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice, and to lay a foundation for finding new targets for the treatment of ovarian cancer. **Methods:** Human epithelial ovarian cancer SKOV3 cells in logarithmic growth phase were selected to establish a human epithelial ovarian cancer xenograft model in nude mice. Nude mice with successful model establishment were randomly divided into control group and HMGB1-siRNA group. On the 7th, 9th, 11th, 14th, and 16th days after cell inoculation, the same amount of saline and HMGB1-siRNA were respectively injected into two groups of mice under the armpit. After 3 weeks, the nude mice were sacrificed by cervical dislocation, the tumor tissues were separated, and the volume of the tumor was measured. The apoptosis of transplanted tumor cells was detected by Tunnel staining. The expressions of HMGB1, STAT3 and p-STAT3 were detected by Western blotting. The expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and microvascularization were detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with the control group, the growth of tumor volume slowed down in HMGB1 siRNA group, and on the 21st day, the tumor volume of HMGB1-siRNA group was significantly smaller than that of the control group ($P < 0.05$). HMGB1-siRNA successfully knocked down the expression of HMGB1 mRNA in transplanted

[基金项目] 武汉市卫生计生委员会临床医学科研基金资助项目(No. WX17D16); 湖北省科技厅科技条件资源开发项目资助(No. 2015BCE099)。Project supported by the Clinical Medicine Research Fund Project from the Medical and Family Planning Commission of Wuhan City (No. WX17D16), and the Resources Development Project of Hubei Provincial Science and Technology Department (No. 2015BCE099)

[作者简介] 吴美琴(1973-), 女, 本科, 副主任医师, 主要从事卵巢癌相关的基础与临床研究, E-mail: 2513928132@qq.com

[通信作者] 朱宏飞(ZHU Hongfei, corresponding author), 博士, 副主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事麻醉与危重症医学的基础与临床研究以及模式动物的研发与推广应用, E-mail: zhf73@126.com

tumor tissue. The apoptosis rate of tissue cells in HMGB1-siRNA group was significantly increased ($[34\pm 8]\%$ vs $[6\pm 2]\%$, $P=0.04$), and the expressions of HMGB1 and p-STAT3 were significantly reduced ($P<0.05$). The expression of VEGF-A and the number of microvessels were significantly lower than those of the control group (both $P<0.05$). **Conclusion:** Knockdown of HMGB1 gene reduces the expression of VEGF-A and microvessel formation possibly by inhibiting the HMGB1/STAT3 signaling pathway, thereby promoting the apoptosis of tumor tissues and slowing the growth of xenografts.

[Key words] high mobility group box 1 (HMGB1); ovarian cancer; SKOV3 cell; VEGF; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 629-633. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.06.006]

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的疾病之一,近年来其发病率明显上升,我国已步入肿瘤高发国家行列^[1]。卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,病死率位居妇科恶性肿瘤之首,严重威胁着妇女的健康与生命^[2-3]。如何改善卵巢癌患者的预后、延长其生存期是临床医生面临的困境之一,因此,寻找新的治疗靶点是研究者急需解决的问题。高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1)普遍存在于哺乳动物组织细胞中,然而在胸腺、淋巴组织、睾丸和新生儿的肝脏中有高表达。HMGB1最初是作为核蛋白被发现的,其在调控一些和肿瘤发生有关基因的转录中起重要作用,如TNF- α 、胰岛素受体和乳腺癌1号基因(breast cancer 1, BRCA1)等^[4-6]。细胞外的HMGB1可以促进肿瘤的存活,生长和转移;肿瘤细胞表面高表达的HMGB1可发挥趋化性作用,促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移。HMGB1可由坏死细胞释放,诱导血管内皮细胞生长、迁移及促进组织修复和血管生成而被定义为促血管生成因子^[7-9]。由于HMGB1与肿瘤的发生有如此密切的相关性,从而使其成为具有希望的抗肿瘤治疗的靶向分子。本研究以人上皮性卵巢癌细胞株SKOV3细胞建立裸鼠皮下移植瘤模型,观察敲降HMGB1对移植瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

SKOV3细胞来自中国科学院细胞库。裸鼠购自北京维通利华公司,实验动物合格证号为No. 11401300077092。DAB浓缩型试剂盒购自Bioswamp公司,Western blotting(WB)实验所用HMGB1、信号转导因子和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、P-STAT3、VEGF-A和CD34兔单抗均购自Abcam公司,GAPDH兔单抗购自CST公司,HRP标记的羊抗兔IgG购自迈新公司。

1.2 裸鼠成瘤实验及分组

取对数生长期SKOV3细胞用0.1%的胰酶进行消化,至镜下细胞呈椭圆形至球形时,用含10%新生牛血清的RPMI 1640终止消化,吸管轻轻吹打至细胞

完全悬浮后收集至离心管,以 $1\ 200\times g$ 离心5 min,弃上清,加入RPMI 1640稀释至 2.5×10^7 个/ml,吹打混匀配置成单细胞悬液。取单细胞混悬液,于无菌环境中在裸鼠背侧近右前肢处进行皮下接种,每只裸鼠接种0.2 ml(接种细胞数约 5×10^6 个/只)。每日观察瘤体生长情况,于接种后第5天测量移植瘤直径,移植瘤直径在3~5 mm的裸鼠入选,随机将其分成对照组和HMGB1-siRNA组,每组8只。接种后,每隔2 d测量肿瘤体积,计算公式为 $V=0.5236\times L(\text{长度})\times W^2(\text{宽度})$ 。3周后颈椎脱臼法处死裸鼠,分离肿瘤组织,测量肿瘤的体积,取每组均数制作肿瘤生长曲线。实验末,统一以过量戊巴比妥钠麻醉致死,剥离皮下肿瘤结节称量瘤质量。

1.3 HMGB1-siRNA对移植瘤裸鼠的治疗实验

取1 μl HMGB1-siRNA(10 $\mu\text{mol/L}$)稀释于50 μl Opti-MEM中,轻轻吹吸3次混匀。取3 μl Lipofectamine[®] RNAiMAX稀释于50 μl Opti-MEM中,轻轻吹吸3次混匀。将以上siRNA混合液加入Lipofectamine[®] RNAiMAX混合液中并轻轻混匀。分别于移植瘤接种第7、9、11、14、16天于裸鼠腋下注射HMGB1-siRNA,100 μl /只,对照组在相同时间点注射等量生理盐水。

1.4 qPCR检测移植瘤组织中HMGB1的表达

用TRIzol法提取移植瘤总RNA后逆转录得到cDNA,以qPCR的方法检测组织中HMGB1基因的表达水平。引物序列:HMGB1-F为GCATCCTGGCTTATC, HMGB1-R为TCTGTAGGCAGCAATA; GAPDH-F为CCTTCCGTGTTCCCTAC, GAPDH-R为GACAACCTGGTCCTCA。PCR扩增条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,随后95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s,扩增38个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。目标基因的表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

1.5 TUNEL法检测敲降HMGB1对移植瘤细胞凋亡的影响

取两组裸鼠移植瘤组织,以甲醛固定,洗涤,脱水,透明,浸蜡,包埋后成蜡块后,切片,再脱蜡,水化。PBS冲洗2 min \times 3次,采用蛋白酶K(20 $\mu\text{g/ml}$, 10 mmol/L Tris/HCl配制, pH=7.4~8.0)21~37 $^{\circ}\text{C}$ 消化15~30 min, PBS冲洗2 min \times 3次;加入25~50 μl

TUNEL反应液, 37 °C作用 60 min, PBS冲洗 3 min×3次; 滴加 25~50 μl 的 AP 抗体, 37 °C作用 30 min, PBS冲洗 3 min×3次; 滴加 BCIP/NBT, 37 °C作用 20 min, PBS冲洗 3 min×3次; 复染, 封片, 烘干。镜下观察染色切片, 以细胞核染成蓝黑色者为凋亡细胞。在 400 倍视野下随机选取 5 个癌细胞区, 记数细胞总数和凋亡细胞数, 计算 TUNEL 染色阳性细胞的百分率, 即为凋亡率。凋亡率=凋亡细胞数/癌细胞总数×100%。

1.6 WB检测敲降HMGB1对移植瘤组织中HMGB1和STAT3蛋白表达的影响

按照蛋白提取试剂盒说明书, 提取肿瘤组织总蛋白, 根据 BCA 蛋白定量结果上样, 行 10% SDS-PAGE, 转膜、洗涤, 加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 4 °C 下分别孵育 HMGB1(1:20 000)、STAT3(1:1 000)、p-STAT3(1:5 000)一抗过夜, TBST 洗 3 次, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗 3 次, 曝光显影。采用 BIO-RAD Image Lab 软件进行灰度值分析并计算目的蛋白的相对表达量。

1.7 免疫组化染色技术检测敲降HMGB1对移植瘤组织中VEGF-A和CD34表达的影响

取两组裸鼠移植瘤组织, 甲醛固定、洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋成蜡块后, 切片、脱蜡、水化后制成组织切片。用柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复, 玻片置于 500 ml 柠檬酸钠缓冲液中 (0.01 mol/L, pH=6.0), 加热沸腾 10 min, 冷却, PBS 洗涤 3 次。H₂O₂ 灭活内源性过氧化氢酶 15 min, PBS 冲洗。加 0.2% 的 Triton×100 通透 10 min。滴加 10% 山羊血清封闭, 室温孵育 20 min。然后滴加 VEGF-A 抗体 (稀释比例 1:200) 和 CD34 抗体 (稀释比例 1:500), 阴性对照滴加 PBS, 4 °C 过夜。PBS 洗涤 3 次, 加二抗, 室温孵育 20 min, PBS 洗涤 3 次后加 DAB 显色, 终止反应。玻片置苏木精溶液中染色 4 min, 去离子水浸泡 1 min。室温晾干玻片, 浸二甲苯透明、封片。将玻片晾干, 在显微镜下观察。VEGF-A 评判标准: 不显色评 0 分, 浅黄色评 1 分, 黄色评 2 分, 棕黄色评 3 分; 低倍镜下扫视整张切片, 挑选 3 个阳性视野后计数, 每个视野计数细胞 300 个, 计算阳性细胞百分比: <6% 评 0 分, ≥6%~<26% 评 1 分, ≥26%~<51% 评 2 分, ≥51%~<76% 评 3 分, ≥76% 评 4 分; 以上两项评分之和作为 VEGF-A 表达的最终评分。CD34 评判标准: 被抗体染色的单个内皮细胞或者细胞团, 无论形成官腔与否, 只要与周边界清晰, 均视作 1 个新生微血管 (其中交界区软组织内微血管及管径 >8 个红细胞直径的血管均排除在外)。首先在低倍镜下找出 3 个微血管密集区, 然后在高倍视野计数, 平均值作为最

终分数值。

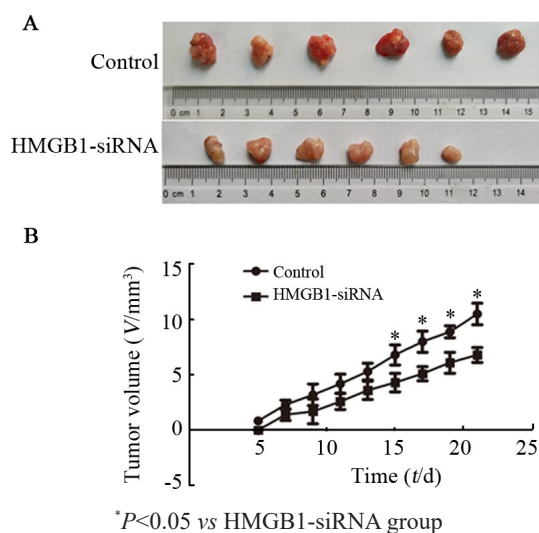
1.8 统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计分析, 正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 敲降HMGB1抑制SKOV3细胞移植瘤的生长

测量移植瘤的体积见图 1。两组的肿瘤体积均逐渐增加, 但在第 15、17、19、21 天时 HMGB1-siRNA 组的移植瘤体积显著小于对照组 (均 *P*<0.05)。



A: Transplanted tumor in both groups of nude mice at day 21; B: Growth curve of transplanted tumor

图 1 敲降 HMGB1 抑制 SKOV3 细胞移植瘤的生长
Fig.1 Knockdown of HMGB1 inhibited the growth of SKOV3 cell xenograft

2.2 敲降HMGB1促进移植瘤细胞的凋亡

以 TUNEL 染色法分析两组肿瘤组织中细胞的凋亡情况, 结果 (图 2) 显示, HMGB1-siRNA 组的细胞凋亡率较对照组显著升高 [(34±8)% vs (6±2)%, *P*=0.04]。

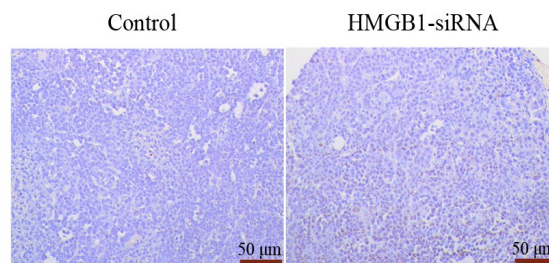


图 2 敲降 HMGB1 促进移植瘤组织中细胞的凋亡 (×200)
Fig.2 Knockdown of HMGB1 promoted apoptosis of cells in xenografts (×200)

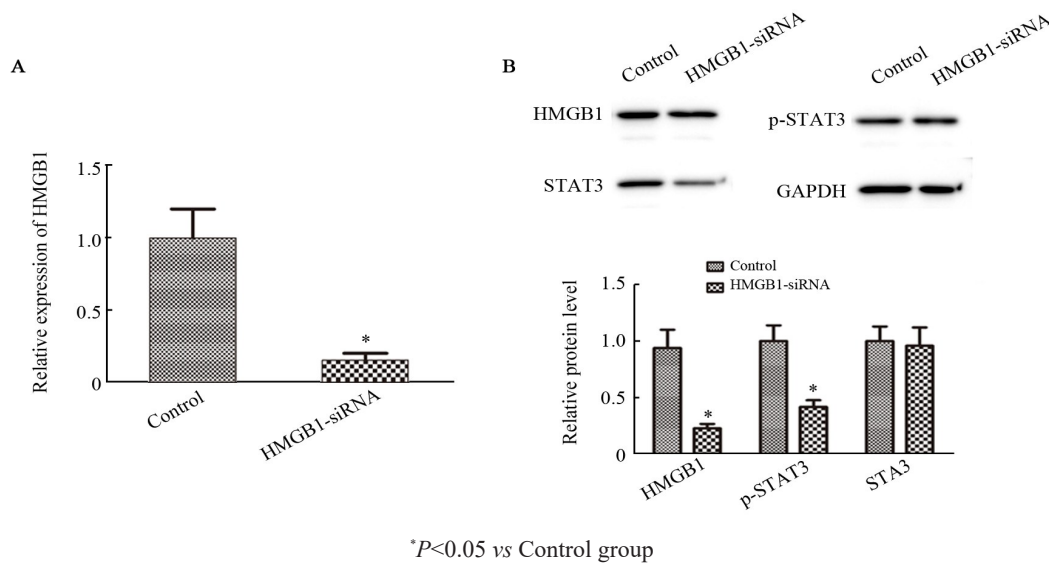
2.3 HMGB1-siRNA 对移植瘤组织中 HMGB1、STAT3、p-STAT3 表达的影响

qPCR 检测结果(图 3A)显示, HMGB1-siRNA 组的 HMGB1 mRNA 表达较对照组显著降低 ($P < 0.05$), 说明注射 HMGB1-siRNA 成功敲降了细胞中 HMGB1 mRNA 的表达。WB 检测结果(图 3B)显示, 与对照组相比, HMGB1-siRNA 组的 HMGB1 和 p-STAT3 表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 STAT3 的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 HMGB1-siRNA 抑制移植瘤组织中 VEGF-A 的

表达和微血管形成

免疫组化检测结果(图 4)显示, 对于 VEGF-A 的表达, 可见对照组中细胞质多呈现棕色或黄色, HMGB1-siRNA 组细胞质多呈现蓝色、少量细胞呈黄色; HMGB1-siRNA 组 VEGF-A 表达显著低于对照组 (2.25 ± 0.96 vs 4.50 ± 1.29 , $P = 0.031$)。对于 CD34 的表达, HMGB1-siRNA 组中可见较多棕黄色阳性细胞聚集并排列规律, 呈现半圆形或线性, 而对照组中棕黄色细胞相对较少; HMGB1-siRNA 组的微血管数显著低于对照组 [(4.25 ± 1.50) vs (9.25 ± 1.71) 个, $P = 0.005$]。



A: HMGB1 mRNA expression detected by qPCR; B: Protein expressions of HMGB1, STAT3 and p-STAT3 in xenografts detected by WB
 图 3 敲降 HMGB1-siRNA 抑制移植瘤组织中 HMGB1 和 p-STAT3 的表达

Fig.3 HMGB1-siRNA inhibited the expressions of HMGB1 and p-STAT3 in transplanted tumor tissues

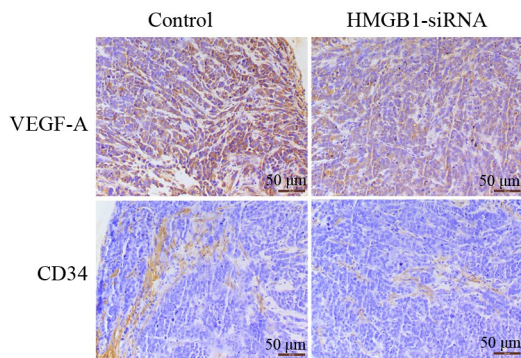


图 4 HMGB1-siRNA 抑制移植瘤组织中 VEGF-A 的表达和微血管形成($\times 200$)

Fig.4 HMGB1-siRNA inhibited the expression of VEGF-A and microvessel formation in xenografts ($\times 200$)

3 讨论

HMGB1 是一种促血管生成因子^[10-11], 可通过多种机制促进肿瘤的存活、生长和转移。本研究中, HMGB1-siRNA 组的肿瘤体积增加速率显著低于对照组, 且细胞

凋亡率显著升高, 表明敲降 HMGB1 后对裸鼠卵巢肿瘤的生长产生一定抑制作用。STAT3 是 STAT 家族成员之一, 定位于细胞质内, 被激活后转入核内和相应 DNA 结合, 引发靶基因转录, 调控信号转导和转录。STAT3 信号转导通路被激活后, 作用于特异的 DNA 片段, 调控靶基因的转录, 参与细胞的增殖、分化和凋亡等过程。STAT3 的异常活化可引起细胞异常分化和增殖, 并抑制细胞凋亡, 导致恶性转化, 促进肿瘤的形成^[12-13]。研究发现, STAT3 在前列腺癌^[14]、乳腺癌^[15]、宫颈癌^[16]和肺癌^[17]等多种恶性肿瘤中呈现高表达。本研究发现, HMGB1-siRNA 组的 p-STAT3 表达较对照组显著降低, 提示敲降 HMGB1 基因可能抑制 p-STAT3 的表达, 减缓卵巢癌的发展。

侵袭和转移是卵巢癌患者死亡的重要因素, 血管新生为侵袭和转移提供基础, 在此过程中起关键作用, 肿瘤血管生成过程复杂。肿瘤缺血缺氧的微环境可刺激肿瘤细胞增加分泌多种血管生成因子, 诱导邻近的血管内皮细胞产生变形, 增加了血管通透性^[18]。血管内皮细胞和肿瘤细胞又将同时释放蛋

白水解酶,促使毛细血管基底膜和细胞外基质降解,毛细血管后微静脉的血管内皮细胞向外迁徙形成血管新芽,内皮细胞不断增殖使管腔形成,伴随血管平滑肌细胞等血管周围细胞移入至内皮层从而形成完整的血管壁,肿瘤微血管不断分化进而形成新生血管网。VEGF是目前已知最强的血管通透剂,它能导致癌性腹水或肿瘤间质水肿,而且导致血浆、纤维等蛋白向血管外渗出,导致细胞外基质的改变,从而促进血管的形成,是重要的与恶性肿瘤侵袭、转移和腹水形成相关的生长因子。VEGF-A是VEGF家族的一员,除了参与血管的生成,其主要可调控细胞的黏附性,与肿瘤的发展进程密切相关^[19]。CD34选择性表达于血管内皮细胞,由于CD34为新生血管的标志物,其通常在肿瘤组织中呈现高表达,具有促血管生成作用,调节细胞黏附能力,增加细胞的迁移能力^[20]。本研究发现, HMGB1-siRNA组的VEGF-A和CD34表达显著降低,提示敲降HMGB1基因可能抑制VEGF-A和CD34的表达,抑制血管的生成,减缓卵巢癌细胞的迁移。

综上,本研究发现敲降HMGB1基因可能通过抑制HMGB1/STAT3信号通路降低VEGF-A的表达和肿瘤微血管形成并促进肿瘤组织细胞凋亡,说明HMGB1可作为卵巢癌治疗的靶点,后续将通过进一步的实验明确其具体机制。

[参 考 文 献]

- [1] GAO P P, LAZARE C, CAO C H, et al. Immune checkpoint inhibitors in the treatment of virus-associated cancers[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 58[2019-11-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6558794/>. DOI:10.1186/s13045-019-0743-4.
- [2] LU Y P, HUANG S, LI P, et al. Prognostic evaluation of preoperative serum C-reactive protein concentration in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(5): 2003-2007. DOI: 10.3892/etm.2015.2350.
- [3] WEBB P M, JORDAN S J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 41: 3-14. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.
- [4] BEGUM S, MOREAU F, LEON CORIA A, et al. Entamoeba histolytica stimulates the alarmin molecule HMGB1 from macrophages to amplify innate host defenses[J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(2): 344-356. DOI:10.1038/s41385-019-0233-6.
- [5] WANG Y B, JIANG Z Q, YAN J N, et al. HMGB1 as a potential biomarker and therapeutic target for malignant mesothelioma[J]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 1-10. DOI:10.1155/2019/4183157.
- [6] STARK K, PHILIPPI V, STOCKHAUSEN S, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice[J]. *Blood*, 2016, 128(20): 2435-2449. DOI: 10.1182/blood-2016-04-710632.
- [7] SIMS G P, ROWE D C, RIETDIJK S T, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 367-388. DOI:10.1146/annurev.immunol.021908.132603.
- [8] MUHAMMAD S, BARAKAT W, STOYANOV S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(46): 12023-12031. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2435-08.2008.
- [9] RANZATO E, PATRONE M, PEDRAZZI M, et al. Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via RAGE-dependent ERK1/2 activation[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2010, 57(1): 9-17. DOI:10.1007/s12013-010-9077-0.
- [10] KANG R, TANG D, SCHAPIRO N E, et al. The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics[J]. *Oncogene*, 2014, 33(5): 567-577. DOI:10.1038/onc.2012.631.
- [11] ROJAS A, DELGADO-LÓPEZ F, PEREZ-CASTRO R, et al. HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3321-3329. DOI:10.1007/s13277-015-3940-y.
- [12] BADGWELL D B, LU Z, LE K, et al. The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2012, 31(1): 68-79. DOI:10.1038/onc.2011.213.
- [13] MAPES J, LI Q X, KANNAN A, et al. CUZD1 is a critical mediator of the JAK/STAT5 signaling pathway that controls mammary gland development during pregnancy[J/OL]. *PLoS Genet*, 2017, 13(3): e1006654[2019-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5363987/>. DOI:10.1371/journal.pgen.1006654.
- [14] ZHANG Z L, DUAN Q K, ZHAO H Q, et al. Gemcitabine treatment promotes pancreatic cancer stemness through the Nox/ROS/NF-κB/STAT3 signaling cascade[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(1): 53-63. DOI:10.1016/j.canlet.2016.08.023.
- [15] HUGHES K, WATSON C J. The multifaceted role of STAT3 in mammary gland involution and breast cancer[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): E1695[2019-11-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032292/>. DOI:10.3390/ijms19061695.
- [16] WEN W, WU J, LIU L, et al. Synergistic anti-tumor effect of combined inhibition of EGFR and JAK/STAT3 pathways in human ovarian cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 100[2019-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4437681/>. DOI: 10.1186/s12943-015-0366-5.
- [17] ZHAO M, GAO F H, WANG J Y, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2011, 73(3): 366-374. DOI:10.1016/j.lungcan.2011.01.002.
- [18] DING G Q, YU S C, CHENG S, et al. Androgen receptor (AR) promotes male bladder cancer cell proliferation and migration via regulating CD24 and VEGF[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2): 578-587.
- [19] XU Z Q, ZHU C C, CHEN C, et al. CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-1/HIF-1α/VEGF-A pathway in colorectal cancer[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 974[2019-11-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155262/>. DOI:10.1038/s41419-018-1010-2.
- [20] CHABOWSKI M, NOWAK A, GRZEGRZOLKA J, et al. Comparison of microvessel density using nestin and CD34 in colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7): 3889-3895. DOI:10.21873/anticancer.12673.

[收稿日期] 2019-12-30

[修回日期] 2020-05-20

[本文编辑] 黄静怡